

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-238674

(43)Date of publication of application : 04.09.2001

(51)Int.Cl.

C12N 15/09
C12M 1/00
C12Q 1/68
G01N 21/64
G01N 33/53
G01N 33/566
G01N 35/02
// G11B 7/09

(21)Application number : 2000-053312

(71)Applicant : NIKON CORP

(22)Date of filing : 29.02.2000

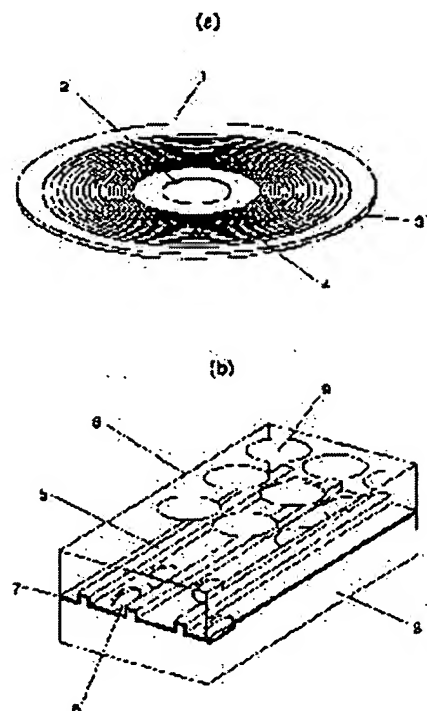
(72)Inventor : IWASAKI YUTAKA
SUZUKI YOSHIHIKO

(54) DNA ARRAY, DNA ARRAY READER AND APPARATUS FOR PRODUCING DNA ARRAY

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To solve problems that reading cannot be carried out at a high speed while maintaining a high S/N ratio of a confocal microscope method in a conventional DNA array reader.

SOLUTION: This DNA array reader capable of carrying out the scanning of a plurality by rotating a DNA array provided with a plurality of spots comprising a DNA probe immobilized in a substrate and arranged in a concentric form or a helical form is obtained.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

This Page Blank (uspto)

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

This Page Blank (uspto)

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-238674

(P2001-238674A)

(43) 公開日 平成13年9月4日 (2001.9.4)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード* (参考)
C 1 2 N 15/09		C 1 2 M 1/00	A 2 G 0 4 3
C 1 2 M 1/00		C 1 2 Q 1/68	A 2 G 0 5 8
C 1 2 Q 1/68		G 0 1 N 21/64	F 4 B 0 2 4
G 0 1 N 21/64		33/53	M 4 B 0 2 9
33/53		33/566	4 B 0 6 3

審査請求 未請求 請求項の数20 O L (全 11 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-53312 (P2000-53312)

(22) 出願日 平成12年2月29日 (2000.2.29)

(71) 出願人 000004112

株式会社ニコン

東京都千代田区丸の内3丁目2番3号

(72) 発明者 岩崎 豊

東京都千代田区丸の内3丁目2番3号 株式会社ニコン内

(72) 発明者 鈴木 美彦

東京都千代田区丸の内3丁目2番3号 株式会社ニコン内

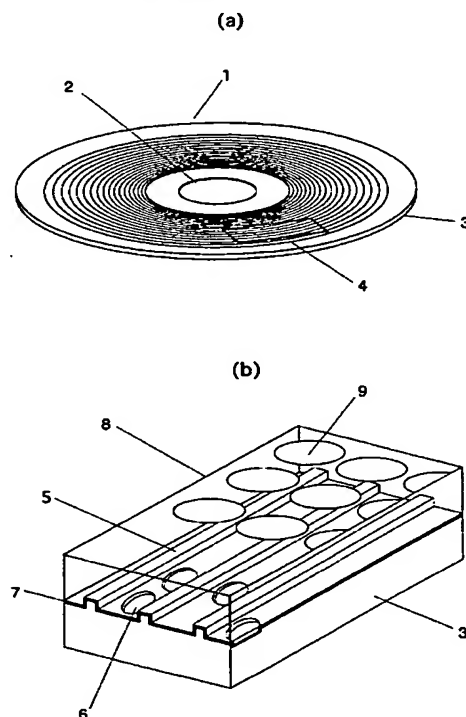
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 DNAアレイ、DNAアレイ読み取り装置、及びDNAアレイ製造装置

(57) 【要約】

【課題】 従来のDNAアレイ読み取り装置（アレイリーダー）では、コンフォーカル顕微鏡方式の高いS/N比を維持したまま、高速で読み取りを行うことができないという問題があった。

【解決手段】 DNAプローブが基板に固定化されている複数のスポットを有し、前記スポットは同心円状または螺旋状に配列されているDNAアレイを回転させることによって前記スポットの走査を行うDNAアレイ読み取り装置を提供する。



BEST AVAILABLE COPY

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 DNAプローブが基板に固定化されている複数のスポットを有し、

前記スポットは同心円状または螺旋状に配列されていることを特徴とするDNAアレイ。

【請求項 2】 前記スポットは前記配列の長さ方向に対して区画分けされ、

該各区画毎に互いに異なるアドレスマークを更に有し、該アドレスマークは読み取り可能に記録されていることを特徴とする請求項 1 に記載のDNAアレイ。

【請求項 3】 トラッキングマークを更に有し、前記スポットは前記トラッキングマークに沿って形成されていることを特徴とする請求項 1 に記載のDNAアレイ。

【請求項 4】 トラッキングマークを更に有し、前記スポットは前記トラッキングマークに沿って形成されていることを特徴とする請求項 2 に記載のDNAアレイ。

【請求項 5】 表面が反射面になっている基板の前記表面に形成されているアドレスマーク及びトラッキングマークと、

前記基板の表面に積層されている透明部材と、該透明部材の表面にDNAプローブが固定化されている複数のスポットとを有し、

前記トラッキングマークは同心円状または螺旋状に配列されていて、

前記スポットは、前記トラッキングマークに沿って配列されていて、且つ配列の長さ方向に対して区画分けされていて、

前記アドレスマークは前記区画毎に形成されていて、前記区画毎に互いに異なり、且つ読み取り可能に記録されていることを特徴とするDNAアレイ。

【請求項 6】 前記反射面が反射膜であることを特徴とする請求項 5 に記載のDNAアレイ。

【請求項 7】 請求項 1 から 6 のいずれかに記載のDNAアレイを回転させることによって前記スポットの走査を行うことを特徴とするDNAアレイ読み取り装置。

【請求項 8】 請求項 2、4、5、6 のいずれかに記載のDNAアレイを回転させることによって前記スポットの走査を行い、且つ、前記スポット走査の際に前記アドレスマークに従って前記スポットを独立に読み取ることを特徴とするDNAアレイ読み取り装置。

【請求項 9】 請求項 3、4、5、6 のいずれかに記載のDNAアレイを回転させることによって前記スポットの走査を行い、且つ、前記スポットの走査の際に前記トラッキングマークに追従するトラッキングサーボ機能を有することを特徴とするDNAアレイ読み取り装置。

【請求項 10】 請求項 4、5、6 のいずれかに記載のDNAアレイを回転させることによって前記スポットの走査を行い、前記スポットの走査の際に前記トラッキングマークに追従するトラッキングサーボ機能を有し、且つ前

記スポット走査の際に前記アドレスマークに従って前記スポットを独立に読み取ることを特徴とするDNAアレイ読み取り装置。

【請求項 11】 前記DNAアレイの回転に伴う前記DNAアレイの基板の表面の変動に追従するフォーカシングサーボ機構を有することを特徴とする請求項 7 から 10 のいずれかに記載のDNAアレイ読み取り装置。

【請求項 12】 DNAアレイを固定し、回転させる回転機構と、

10 光源と、

該光源から出射される光を前記DNAアレイに照射する照射光学系と、

前記DNAアレイ上に照射される光と前記DNAアレイとの相対的な位置を変化させる移動装置と、

前記DNAアレイからの反射光を検出する反射光検出光学系と、

前記DNAアレイのスポットからの蛍光を検出する蛍光検出光学系と、

制御装置とを有し、

20 前記反射光検出光学系は、前記DNAアレイに形成されているトラッキングマークに基づき前記制御装置によるトラッキングサーボ機能と、前記DNAアレイに形成されているアドレスマークに基づき前記制御装置によりアドレスの読み出しを行う機能とを有し、

前記蛍光検出光学系は、光検出器と、該光検出器へ前記蛍光を選択的に通過させるアパチャーとを有し、前記光検出器からの信号が前記制御装置に入力し、前記スポット走査の際に前記アドレスマークに従って前記スポットを独立に読み取ることを特徴とするDNAアレイ読み取り装置。

30

【請求項 13】 前記反射光検出光学系は、前記DNAアレイの回転に伴う前記DNAアレイの表面の変動に追従するフォーカシングサーボ機能を更に有することを特徴とする請求項 12 に記載のDNAアレイ読み取り装置。

【請求項 14】 基板を回転させながら、スポット状にDNAプローブを固定化することにより、前記基板上に前記DNAプローブの複数のスポットが形成されたDNAアレイを製造することを特徴とするDNAアレイ製造装置。

40 【請求項 15】 前記DNAアレイがトラッキングマークを更に有し、

前記DNAプローブの固定化の際に前記トラッキングマークに追従するトラッキングサーボ機能を有することを特徴とする請求項 14 に記載のDNAアレイ製造装置。

【請求項 16】 前記DNAアレイは読み取り可能なアドレスマークを更に有し、

前記スポットへの前記DNAプローブの固定化の際に、前記アドレスマークに従って、前記スポットへの前記DNAプローブの固定化を独立に行うことを特徴とする請求項 14 または 15 に記載のDNAアレイ製造装置。

50 【請求項 17】 前記基板の回転に伴う前記基板の表面の

変動に追従するフォーカシングサーボ機能を有することを特徴とする請求項 14 から 16 のいずれかに記載の DNA アレイ製造装置。

【請求項 18】基板を固定し、回転させる回転機構と、位置検出用光源と、
該位置検出用光源から出射される光を前記基板に照射する照射光学系と、
前記基板上に照射される光と前記基板との相対的な位置を変化させる移動装置と、
前記位置検出用光源から出射される光による前記基板からの反射光を検出する反射光検出光学系と、
前記基板上にスポット状に DNA プローブを固定化する装置と、
制御装置とを有し、
前記反射光検出光学系は、前記基板上に形成されているトラッキングマークに基づき前記制御装置によるトラッキングサーボ機能と、前記基板上に形成されているアドレスマークに基づき前記制御装置によりアドレスの読み出しを行う機能とを有し、
前記基板上の所定の位置に所定の DNA プローブを固定化するため、前記 DNA プローブを固定化する装置が前記制御装置により制御されていることを特徴とする DNA アレイ製造装置。

【請求項 19】基板を固定し、回転させる回転機構と、位置検出用光源と、
光反応性保護基除去用光源と、
前記位置検出用光源から出射される光を前記基板に照射する照射光学系と、
前記光反応性保護基除去用光源から出射される光を前記基板に照射する照射光学系と、
前記基板上に照射される光と前記基板との相対的な位置を変化させる移動装置と、
前記位置検出用光源から出射される光による前記基板からの反射光を検出する反射光検出光学系と、
制御装置とを有し、
前記反射光検出光学系は、前記基板上に形成されているトラッキングマークに基づき前記制御装置によるトラッキングサーボ機能と、前記基板上に形成されているアドレスマークに基づき前記制御装置によりアドレスの読み出しを行う機能とを有し、
前記基板上の所定の位置に所定の DNA プローブを固定化するため、前記光反応性保護基除去用光源のオンオフが前記制御装置により制御されていることを特徴とする DNA アレイ製造装置。

【請求項 20】前記反射光検出光学系は、前記基板の回転に伴う前記基板の表面の変動に追従するフォーカシングサーボ機能を更に有することを特徴とする請求項 18 または 19 に記載の DNA アレイ製造装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

BEST AVAILABLE COPY

【発明の属する技術分野】本発明は、遺伝子構成要素間の相補的相互作用を利用して、遺伝子構成要素の構造を特定する DNA チップ、DNA アレイ、あるいは DNA アッセイと呼ばれるデバイス、及び DNA アレイ読み取り装置、並びに DNA アレイ製造装置に関する。

【0002】

【従来の技術】近年、医療分野における病原の特定や疾病の治療、農業分野での遺伝子組み替えによる種の改良等非常に幅広い分野で生物のゲノムの利用が行われているようになってきている。このようなゲノムの利用に際しては、対象生物の遺伝子レベルの構造の解明が不可欠である。

【0003】そのような遺伝子レベルでの検体の構造、すなわち遺伝子内の注目部位のヌクレオチド配列を特定するための装置として、DNA アレイまたは DNA チップ（ここでは、DNA アレイで総称する）及びその読み取り装置が開発され、実用に供されている。例えば、米国のゼネラルスキャニング社は、ScanArray シリーズという名称の DNA アレイ、及び DNA アレイ読み取り装置を販売している。このような DNA アレイ読み取り装置では検体のヌクレオチド配列は次のようにして同定される。

【0004】DNA アレイは、DNA プローブの 1 つである所定の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを適当な間隔で、板状の基板にスポット状に固定化したものである。通常、一つのスポットの大きさは、20～200 μm 程度であり、一つのスポット内には、数百万本程度の同一のオリゴヌクレオチドが固定化されている。固定化される各オリゴヌクレオチドの塩基数は、20 程度であることが一般的である。

【0005】基板としては、ガラス基板、Si 基板、プラスチック基板が用いられている。これらのうちもっとも広く用いられているのは、顕微鏡用のスライドガラスを基板に用いたものである。典型的なスライドガラス基板は、大きさが 75mm×25mm、厚さが 1mm である。

【0006】一つの DNA アレイ全体では、このようなスポットは 50 μm ～500 μm の間隔でマトリクス状に配列されている。各スポットに含まれるオリゴヌクレオチドは、スポット毎に互いに異なるヌクレオチド配列を有している。

【0007】基板上にオリゴヌクレオチドを固定化する方法としては、基板上で一層ずつ、オリゴヌクレオチドを合成させながら固定化する方法と、あらかじめ別途合成させておいたオリゴヌクレオチドを基板上に固定化する方法がある。前者の方法における代表的な技術は、フォトリソグラフィ技術である。また、後者の方法にはメカニカルマイクロスポッティング技術がある。インクジェット技術はどちらの方法にも使用される。

【0008】フォトリソグラフィ技術は、Fordor 等によって開発された技術で（Science, 251 号、767 頁（1991 年）参照）光反応性保護基を利用する。この保護基は、

各塩基モノマーと同種、あるいは別種の塩基モノマーとの結合を阻害する働きがあり、この保護基が結合している塩基末端には、新たな塩基の結合反応は生じない。また、この保護基は、光照射によって容易に除去することができる。

【0009】まず、基板全面にこの保護基を有するアミノ基を固定化させておく。次に、所望の塩基を結合させたいスポットにのみ、通常の半導体プロセスで使用されるフォトリソグラフィ技術と同様の方法を使って、選択的に光照射を行う。これにより、光が照射された部分の塩基のみ、後続の結合によって次の塩基を導入できる。ここに、同じ保護基を末端に有する所望の塩基を結合させる。そして、フォトマスクの形状を変更して、別のスポットに選択的に光照射を行う。このあと、同様にして、保護基を有する塩基を結合させる。この工程をスポット毎に所望の塩基配列が得られるまで繰返すことによってDNAアレイが作製される。

【0010】次に、インクジェット技術について述べる。インクジェット技術は、熱、圧電効果を利用し非常に小さい液滴を2次元平面の所定の位置に射出する技術であり、主にプリンター装置において広く用いられている。DNAアレイの製造には、圧電素子をガラスキャピラリーと組み合わせた構造のインクジェット装置が使用される。液体チャンバーに接続された圧電素子に電圧を加えることにより、圧電素子の体積の変化によってチャンバー内の液体が、チャンバーに接続された、キャピラリーから液滴となって射出される。射出される液滴の大きさは、キャピラリーの径、圧電素子の体積変化量、液体の物理的性質によって決定されるが、一般には、直径が30 μm 程度である。圧電素子を用いたインクジェット装置は、このような液滴を10kHz程度の周期で射出することができる。

【0011】このようなインクジェット装置を使ったDNAアレイ製造装置は、インクジェット装置とDNAアレイ基板とを相対運動させることにより、DNAアレイ上の所望のスポットに所望の液滴を滴下することができる。インクジェット装置を使ったDNAアレイ製造装置には、大きくわけて2種類ある。1つはただ1台のインクジェット装置を用いたDNAアレイ製造装置であり、もう1つはマルチヘッドのインクジェット装置を用いた装置である。

【0012】ただ1台のインクジェット装置を用いたDNAアレイ製造装置は、オリゴマー末端の保護基を除去する試薬を所望のスポットに滴下する構成になっている。所望の塩基を導入したいスポットの保護基を、このインクジェット装置を用いて除去して活性な状態にした後、DNAアレイ全体に所望の塩基の結合反応操作を実施する。この際、インクジェット装置からの試薬の滴下によって、末端が活性化したオリゴマーを持つスポットのみに所望の塩基が結合する。その後、新たに付加した塩基の末端を保護する操作を行う。次に、保護基を除去するス

ポットを変更してこの操作を所望のヌクレオチド配列が得られるまで繰返す。

【0013】一方、マルチヘッドのインクジェット装置を用いたDNAアレイ製造装置は、各塩基を含む試薬毎にインクジェット装置を用意することによって、各スポット毎に所望の塩基を直接結合させることができる構成になっており、前述した1台のインクジェット装置を用いたDNAアレイ製造装置よりも高いスループットが得られる。

【0014】あらかじめ合成したオリゴヌクレオチドを基板に固定化させる方法のうち、メカニカルマイクロスポッティング技術は、ステンレス製のピンの先端についたオリゴヌクレオチドを含む液体を機械的に基板上に押し付けて固定化していく技術である。この方法で得られるスポットは、50~300 μm 程度になる。マイクロスポッティング後には、UV光による固定化等の後処理が行われる。

【0015】以上のようにして作製されたDNAアレイを用いて、次のようにして検査対象の注目部位のヌクレオチド配列を特定する。

【0016】前述のようにDNAプローブが固定化されたDNAアレイに検査対象から抽出したDNAやRNAを添加する。検体であるDNA、RNAは、あらかじめ増殖操作が施され、更に、蛍光物質によるマーキング（蛍光マーカー）が施されている。

【0017】検体のDNAアレイへの添加は、通常液相で行われる。添加液中の検体が、DNAアレイに固定化されたオリゴヌクレオチドの配列と相補関係にあるヌクレオチド配列を有していると、検体中の塩基とチップ上の塩基間に水素結合による部分二重鎖が生じる。この水素結合による二重鎖の形成は、ハイブリダイゼーションと呼ばれる。DNAに含まれるヌクレオチドは、アデニンとチミン、シトシンとグアニンがそれぞれ相補関係となっている。

【0018】この後、ハイブリダイゼーションが生じなかった検体を洗浄、除去する。これにより、検体中に含まれるヌクレオチド配列と相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが固定化されたスポットにのみ、検体に付加された蛍光マーカーが残ることになる。マーキングには、蛍光物質の他に放射性同位元素を使用することもある。

【0019】このDNAアレイを一般にアレイリーダーと呼ばれる読み取り装置で解析する。アレイリーダーは、各スポットの蛍光強度を測定して表示する。アレイリーダーの方式には、大きくわけて二種類あり、CCDカメラを使用して同時に複数スポットの蛍光強度を測定する方式と、コンフォーカルレーザ顕微鏡を使用してDNAアレイ上を2次元走査して測定する方式である。コンフォーカルレーザ顕微鏡の光検出器には、光電子倍增管や、アバランシェフォトダイオードが使用されている。

【0020】スポットに照射した光（励起光）の強度に較べて、検体に付加された蛍光マーカーで発生する蛍光は強度が数桁小さいのが普通である。そのため、ダイクロイックミラーを用いた波長による分離や、励起光と蛍光を空間的に分離するビームスプリッタが使用される。蛍光強度の測定は、強度の校正が不要なことから、2波長以上で行われることが一般的である。CCDカメラを用いた方式では、励起光の光源にランプを使用し、広い面積を1度に励起する。コンフォーカルレーザ顕微鏡を使用する方式では、励起光の光源にレーザを使用し、集光したレーザスポットの内部のみを励起する。

【0021】従って、CCDカメラを用いた方式では、約1平方cm程度の広い領域を1度に測定できるのに対して、コンフォーカルレーザ顕微鏡を用いた方式では、1度に直径5〜30 μ m程度の領域しか測定できない。コンフォーカルレーザ顕微鏡を用いた方式では、DNAアレイまたは、コンフォーカルレーザ顕微鏡ヘッドの2次元走査が必要となるため、読み取りのスループットが低下する。この2次元走査は、基板の載ったステージをXとYの2軸方向に走査することで実現する。典型的な走査時間は、20mm \times 60mmの領域を10 μ mの解像度でスキャンした場合で5〜15分程度必要である。

【0022】一方、コンフォーカルレーザ顕微鏡を使用した方法では、いわゆるコンフォーカルセクションングによって、DNAアレイの深さ方向のコンタミによるノイズ光やフレアを取り除くことができ、CCD方式に比較して高いS/N比が得られることが特徴である。

【0023】いずれの方式によっても、測定されたDNAアレイ上の蛍光強度分布は16ビット程度の強度の分解能を有する2次元の画像データとして出力される。この際、画像判定を容易にするために、擬似色付け処理が行われる場合もある。出力された画像内で蛍光強度が大きいスポットは、検体中に該スポットのオリゴヌクレオチドの配列と相補的なヌクレオチド配列が含まれていることを示している。このようにして、どのスポットの蛍光強度が大きいかによって検体の遺伝子の注目部位のヌクレオチド配列を知ることができる。

【0024】

【発明が解決しようとする課題】ところが、従来のDNAアレイ読み取り装置（アレイリーダー）では、コンフォーカル顕微鏡方式の高いS/N比を維持したまま、高速で読み取りを行うことができないという問題があった。

【0025】

【課題を解決するための手段】上記問題を解決するために、本発明は第一に「DNAプローブが基板に固定化されている複数のスポットを有し、前記スポットは同心円状または螺旋状に配列されていることを特徴とするDNAアレイ（請求項1）」を提供する。

【0026】第二に「前記スポットは前記配列の長さ方向に対して区画分けされ、該各区画毎に互いに異なるア

ドレスマークを更に有し、該アドレスマークは読み取り可能に記録されていることを特徴とする請求項1に記載のDNAアレイ（請求項2）」を提供する。

【0027】第三に「トラッキングマークを更に有し、前記スポットは前記トラッキングマークに沿って形成されていることを特徴とする請求項1に記載のDNAアレイ（請求項3）」を提供する。

【0028】第四に「トラッキングマークを更に有し、前記スポットは前記トラッキングマークに沿って形成されていることを特徴とする請求項2に記載のDNAアレイ（請求項4）」を提供する。

【0029】第五に「表面が反射面になっている基板の前記表面に形成されているアドレスマーク及びトラッキングマークと、前記基板の表面に積層されている透明部材と、該透明部材の表面にDNAプローブが固定化されている複数のスポットとを有し、前記トラッキングマークは同心円状または螺旋状に配列されていて、前記スポットは、前記トラッキングマークに沿って配列されていて、且つ配列の長さ方向に対して区画分けされていて、前記アドレスマークは前記区画毎に形成されていて、前記区画毎に互いに異なり、且つ読み取り可能に記録されていることを特徴とするDNAアレイ（請求項5）」を提供する。

【0030】第六に「前記反射面が反射膜であることを特徴とする請求項5に記載のDNAアレイ（請求項6）」を提供する。

【0031】第七に「請求項1から6のいずれかに記載のDNAアレイを回転させることによって前記スポットの走査を行うことを特徴とするDNAアレイ読み取り装置（請求項7）」を提供する。

【0032】第八に「請求項2、4、5、6のいずれかに記載のDNAアレイを回転させることによって前記スポットの走査を行い、且つ、前記スポット走査の際に前記アドレスマークに従って前記スポットを独立に読み取ることを特徴とするDNAアレイ読み取り装置（請求項8）」を提供する。

【0033】第九に「請求項3、4、5、6のいずれかに記載のDNAアレイを回転させることによって前記スポットの走査を行い、且つ、前記スポットの走査の際に前記トラッキングマークに追従するトラッキングサーボ機能を有することを特徴とするDNAアレイ読み取り装置（請求項9）」を提供する。

【0034】第十に「請求項4、5、6のいずれかに記載のDNAアレイを回転させることによって前記スポットの走査を行い、前記スポットの走査の際に前記トラッキングマークに追従するトラッキングサーボ機能を有し、且つ前記スポット走査の際に前記アドレスマークに従って前記スポットを独立に読み取ることを特徴とするDNAアレイ読み取り装置（請求項10）」を提供する。

【0035】第十一に「前記DNAアレイの回転に伴う前

記DNAアレイの基板の表面の変動に追従するフォーカシングサーボ機構を有することを特徴とする請求項7から10のいずれかに記載のDNAアレイ読み取り装置（請求項11）」を提供する。

【0036】第十二に「DNAアレイを固定し、回転させる回転機構と、光源と、該光源から出射される光を前記DNAアレイに照射する照射光学系と、前記DNAアレイ上に照射される光と前記DNAアレイとの相対的な位置を変化させる移動装置と、前記DNAアレイからの反射光を検出する反射光検出光学系と、前記DNAアレイのスポットからの蛍光を検出する蛍光検出光学系と、制御装置とを有し、前記反射光検出光学系は、前記DNAアレイに形成されているトラッキングマークに基づき前記制御装置によるトラッキングサーボ機能と、前記DNAアレイに形成されているアドレスマークに基づき前記制御装置によりアドレスの読み出しを行う機能とを有し、前記蛍光検出光学系は、光検出器と、該光検出器へ前記蛍光を選択的に通過させるアパチャーとを有し、前記光検出器からの信号が前記制御装置に入力し、前記スポット走査の際に前記アドレスマークに従って前記スポットを独立に読み取ることを特徴とするDNAアレイ読み取り装置（請求項12）」を提供する。

【0037】第十三に「前記反射光検出光学系は、前記DNAアレイの回転に伴う前記DNAアレイの表面の変動に追従するフォーカシングサーボ機能を更に有することを特徴とする請求項12に記載のDNAアレイ読み取り装置（請求項13）」を提供する。

【0038】第十四に「基板を回転させながら、スポット状にDNAプローブを固定化することにより、前記基板上に前記DNAプローブの複数のスポットが形成されたDNAアレイを製造することを特徴とするDNAアレイ製造装置（請求項14）」を提供する。

【0039】第十五に「前記DNAアレイがトラッキングマークを更に有し、前記DNAプローブの固定化の際に前記トラッキングマークに追従するトラッキングサーボ機能を有することを特徴とする請求項14に記載のDNAアレイ製造装置（請求項15）」を提供する。

【0040】第十六に「前記DNAアレイは読み取り可能なアドレスマークを更に有し、前記スポットへの前記DNAプローブの固定化の際に、前記アドレスマークに従って、前記スポットへの前記DNAプローブの固定化を独立に行うことを特徴とする請求項14または15に記載のDNAアレイ製造装置（請求項16）」を提供する。

【0041】第十七に「前記基板の回転に伴う前記基板の表面の変動に追従するフォーカシングサーボ機能を有することを特徴とする請求項14から16のいずれかに記載のDNAアレイ製造装置（請求項17）」を提供する。

【0042】第十八に「基板を固定し、回転させる回転機構と、位置検出用光源と、該位置検出用光源から出射

される光を前記基板に照射する照射光学系と、前記基板上に照射される光と前記基板との相対的な位置を変化させる移動装置と、前記位置検出用光源から出射される光による前記基板からの反射光を検出する反射光検出光学系と、前記基板上にスポット状にDNAプローブを固定化する装置と、制御装置とを有し、前記反射光検出光学系は、前記基板上に形成されているトラッキングマークに基づき前記制御装置によるトラッキングサーボ機能と、前記基板上に形成されているアドレスマークに基づき前記制御装置によりアドレスの読み出しを行う機能とを有し、前記基板上の所定の位置に所定のDNAプローブを固定化するため、前記DNAプローブを固定化する装置が前記制御装置により制御されていることを特徴とするDNAアレイ製造装置（請求項18）」を提供する。

【0043】第十九に「基板を固定し、回転させる回転機構と、位置検出用光源と、光反応性保護基除去用光源と、前記位置検出用光源から出射される光を前記基板に照射する照射光学系と、前記光反応性保護基除去用光源から出射される光を前記基板に照射する照射光学系と、前記基板上に照射される光と前記基板との相対的な位置を変化させる移動装置と、前記位置検出用光源から出射される光による前記基板からの反射光を検出する反射光検出光学系と、制御装置とを有し、前記反射光検出光学系は、前記基板上に形成されているトラッキングマークに基づき前記制御装置によるトラッキングサーボ機能と、前記基板上に形成されているアドレスマークに基づき前記制御装置によりアドレスの読み出しを行う機能とを有し、前記基板上の所定の位置に所定のDNAプローブを固定化するため、前記光反応性保護基除去用光源のオンオフが前記制御装置により制御されていることを特徴とするDNAアレイ製造装置（請求項19）」を提供する。

【0044】第二十に「前記反射光検出光学系は、前記基板の回転に伴う前記基板の表面の変動に追従するフォーカシングサーボ機能を更に有することを特徴とする請求項18または19に記載のDNAアレイ製造装置（請求項20）」を提供する。

【0045】

【発明の実施の形態】以下に、本発明による実施の形態を説明するが、本発明はこれらに限られるものではない。

【0046】本発明による第1の実施の形態のDNAアレイについて、図1、図2を参照して説明する。図1は第1の実施の形態のDNAアレイを示す概略構成図である。図1(a)は第1の実施の形態のDNAアレイ全体を示す概略構成図であり、図1(b)は図1(a)の四角形4で示された部分を拡大した模式図である。

【0047】DNAアレイ1は、直径8cmの円盤状であり、中心に回転用のスピンドルに固定されるための穴2が空いている。以降、第1の実施の形態のDNAアレイをDNAデ

ィスクと呼ぶ。基板3は厚さ約1.2mmのポリカーボネート製である。ポリカーボネート製の基板3には、アドレスマーク6のピット及びトラッキングマーク5がスタンパを用いた圧縮成形により形成されている。

【0048】基板3の表面に反射膜である厚さ500nmのアルミ反射層7が蒸着されている。これにより、基板3の表面は、反射面になっている。トラッキングマーク5のピッチは25 μ mであり、アドレスマーク6の段差は、アドレスの読み出しに使用する光源の波長の約1/4である。アルミ反射層7の上には、透明部材であるガラスの層8が50 μ mの厚さで積層されている。第1の実施の形態のDNAディスクではガラスの層8の材料はホウ珪酸ガラスであり、スパッタにより成膜されている。

【0049】ガラスの層8の表面には、トラッキングマーク7に沿ってDNAプローブが固定化されている複数のスポット9が螺旋状に配列されている。図2は、図1(b)のトラッキングマーク間の配列の長さ方向の一系列のスポットを模式に示す図である。図2において、スポット9内の数字は、配列の順番を示す番号である。1つの区画にはアドレスマークと64個のスポット9とが配置されている。このように、スポット9は配列の長さ方向に区画分けされ、各区画毎にアドレスマークを有している。そして、各区画毎のアドレスマークは、互いに異なっている。

【0050】なお、第1の実施の形態のDNAディスクでは、トラッキングマーク5及びスポット9は、螺旋状に配列されているが、同心円状に配列されていてもよい。

【0051】また、第1の実施の形態のDNAディスクでは、基板3を円盤状としたが、基板3の形状は、楕円形、曲線で構成される形状、多角形等であってもよい。

【0052】また、第1の実施の形態のDNAディスクでは、アドレスマーク6のピット及びトラッキングマーク5が圧縮成形により形成されているとしたが、射出成形や2P法等により形成されてもよい。

【0053】また、第1の実施の形態のDNAディスクでは、基板3の上にアルミ反射層7は蒸着により成膜されているが、スパッタ等により成膜してもよい。

【0054】また、第1の実施の形態のDNAディスクでは、基板3がポリカーボネートで作製されているとしたが、ポリ塩化ビニルやアクリル等の樹脂、ガラス、アルミ等の金属、Si等であってもよい。そして、基板3がアルミやSi等の高反射率の材料である場合は、基板3の表面が反射面となっているため、基板3の表面に反射膜を成膜しなくてもよい。この場合、アドレスマーク6のピット及びトラッキングマーク5は、圧縮成形やエッチングや切削加工等により形成される。

【0055】また、第1の実施の形態のDNAディスクでは、透明部材のホウ珪酸ガラスをスパッタで成膜しているが、真空蒸着やCVD等により成膜してもよい。

【0056】また、第1の実施の形態のDNAディスクでは、基板3の反射面の上に透明部材として、ホウ珪酸ガ

ラスを用いているが、石英ガラスやパイレックスガラス等の他のガラスでもよいし、ポリカーボネート、ポリ塩化ビニル、アクリル等の透明な樹脂でもよい。そして、基板にSiを用いた場合には、Si基板の表面にエッチング等によりトラッキングマーク及びアドレスマークを形成した後に、Si基板を熱酸化することによりSiO₂膜を形成し、そのSiO₂膜を透明部材として用いてもよい。

【0057】また、スポットは64個が同一の区画として配置されているとしたが、同一の区画内のスポットの数は、64個以外の個数であってもよい。

【0058】次に本発明による第2の実施の形態のDNAアレイ読み取り装置について、図3を参照して説明する。図3は、第2の実施の形態のDNAアレイ読み取り装置の概略構成図である。第2の実施の形態のDNAアレイ読み取り装置は、第1の実施の形態のDNAアレイであるDNAディスクを読み取る装置である。以下では、第2の実施の形態のDNAアレイ読み取り装置をDNAディスク読み取り装置と呼ぶ。

【0059】DNAプローブが固定化されたDNAディスク1に検体から抽出し、培養、蛍光色素によるマーキングを施したDNAを含む溶液を添加し、ハイブリダイゼーションを起こさせる。この後、DNAディスク1を洗浄し、余分なDNAを除去する。次にDNAディスク読み取り装置のスピンデル10にDNAディスク1を固定し、サーボモーター11で回転させる。スピンデル10及びサーボモーター11がDNAディスクを固定し、回転させる回転機構である。

【0060】DNAディスク読み取り装置の光学系12は、光源、受光素子、光学素子が一体化しており、一体化した光学系12は、図3中に矢印13で示したDNAディスク1の中心から外周に向かう半径内の任意の位置に移動できる構成になっている。つまり、DNAディスク読み取り装置はDNAディスク1上に照射される光とDNAディスク1との相対的な位置を変化させる移動装置を有している。

【0061】光源14から出射した光は、コリメータレンズ15、ハーフミラー16を透過し、ミラー17にて反射され、レンズ18によって集光されてDNAディスク1のアルミ反射面19に照射される。コリメータレンズ15、ミラー17、レンズ18が照射光学系を構成する。

【0062】アルミ面19からの反射光は、レンズ18、ミラー17を通過してハーフミラー16によってトラッキング/アドレス検出光学系20に導入される。レンズ18、ミラー17、ハーフミラー16、トラッキング/アドレス検出光学系20が反射光検出光学系を構成する。

【0063】トラッキング/アドレス検出光学系20は、通常の情報記録層である光ディスクのトラッキングサーボ機構に使用されているプッシュプル法、ウオブル法、3ビーム法等のいずれかにより、DNAディスク1のアルミ反射面19に照射される光がトラッキングマークに追従するようにトラッキングサーボを行う。この際、プッシュプル法を使用する場合は、DNAディスク1のトラッキング

マークの幅が適正な値に設定される必要がある。ウオブル法を用いる場合には、DNAディスク1にウオブルマークを導入する必要がある。また、3ビーム法を用いる場合には、DNAディスク1上で3つの集光点をオフセットして形成する光源もしくは光学素子を用いる必要がある。このように、トラッキングサーボ機構を有しているので、DNAディスクの中心に形成されている孔の中心位置がDNAディスクの中心から偏心していたり、DNAディスクをスピンドルに固定する際に偏心していたとしても、トラッキング／アドレス検出光学系からの信号により一体化した光学系12の位置を制御することにより、スポットが固定されている位置から照射光がずれることがない。

【0064】また、トラッキング／アドレス検出光学系20は、アドレスマークを読み取り、DNAディスク1上の位置座標を表す信号を出力する。前述したようにアドレスマークは光源14の波長の $1/4$ の段差を有しているので、光源からの光がアドレスマークのエッジ部分に照射されている場合は段差の上の部分で反射する光と底の部分で反射する光の光路差が光源14の波長の $1/2$ となるため、全反射光の強度は、アドレスマークのエッジ部分以外に照射されている場合の全反射光の強度に比べて小さくなる。そして、前述したように各区画毎のアドレスマークは互いに異なっているので、各アドレスマーク毎の反射光の強度変化を位置座標を表す信号として利用できる。つまり、光源14の波長の $1/4$ の段差を有しているアドレスマークは、読み取り可能に記録されていることになる。

【0065】DNAディスク1が回転して、ミラー17で反射した光がDNAディスク1の表面のDNAプローブが固定化されているスポットに照射され、且つ、当該スポット内にハイブリダイゼーションが生じていると、スポットに照射された光によってDNAディスク1の表面で蛍光が生じる。生じた蛍光は、レンズ18によって集められ、ミラー21によって反射した後、レンズ22によってアパチャー23に集光される。アパチャーの開口部の寸法及び位置は、DNAディスク1の表面からの蛍光が選択的に通過するように設定してあり、通常のコフォーカル顕微鏡型の検出方法と同様の構成になっている。従ってアルミ反射面19や、コンタミや途中の光学系からのフレア等のノイズ光は、アパチャー23で効率よく遮断されることになる。そして、アパチャー23を通過した蛍光は光検出器24によって検出される。レンズ18、ミラー21、レンズ22、アパチャー23、光検出器24が蛍光検出光学系を構成する。

【0066】演算装置25は、トラッキング／アドレス検出光学系20からの位置情報と、光検出器24からの出力を基にどのスポットで、どの程度のハイブリダイゼーションが生じたかを対応づけて出力する。走査時間は、直径8cmのDNAディスクを $10\mu\text{m}$ の解像度でスキャンした場合で1分程度必要である。

【0067】そして、演算装置25に、DNAディスク1上の

各スポットのDNAプローブのヌクレオチド配列に関するデータが記憶されていれば、このデータと以上の読み取り結果との相関から検体DNAの注目部位の構造の推定結果を出力することもできる。

【0068】このように第2の実施の形態においては、ハイブリダイゼーション後の蛍光マーカの検出に、コンフォーカル顕微鏡法を使用しており、高いS/N比を達成することができる。これにより、検出感度が向上するという効果がある。更に、DNAディスクの走査には、DNAディスクの回転運動と、光学系12の1軸走査とを組み合わせることで、X方向とY方向の2軸ステージ走査に較べて、容易に走査速度を向上させることができる。これにより、DNAディスクの読み取り時間を短縮させることができるという効果がある。

【0069】また、第2の実施の形態においては、アドレスマークを有するDNAディスクを用いることにより、アドレスマークを判別して特定の区画のスポットを選択して独立に読み取ることが可能である。これにより、回転走査と相まって、高速、且つランダムに特定のスポットの読み取りを行うことが可能である。これにより、DNAディスクの読み取り時間を短縮させることができるという効果がある。

【0070】このことを利用して、例えば、スポットからの信号強度が小さく、積算測定によってS/N比を向上させようとする場合、全ての走査を繰返すことなく、特に注目している少数のスポットのみについて走査を繰返すような読み取り方法を実施することができる。

【0071】あるいは、1枚のDNAディスクで多種類の検体に対応できるように多種類のDNAプローブを固定化したDNAディスクを大量生産で低コストに作製し、測定時には、測定したい検体に対応したDNAプローブを有するスポットのみを測定することによって、DNAアレイを用いたヌクレオチド配列特定に係る全体のコストを低減させることができるという効果がある。

【0072】これらのように、一部のスポットのみを選択することが可能になるので、DNAディスクはアドレスマークを有していることが好ましい。

【0073】第2の形態では、説明を簡単にするために、単一の読み取り光源のみを示したが、複数の波長で読み取りを行う場合は、光源、受光素子等を増設した構成とすればよい。

【0074】なお、第2の実施の形態による読み取り装置において、回転に伴いDNAディスク1の表面が変動してもレンズ18とDNAディスク1の表面との間隔を一定に保つフォーカシングサーボ機構を有することが好ましい。これによりDNAディスクの表面が歪んでいて、回転に伴いDNAディスクの表面が変動する場合でも、蛍光を検出することが可能となるという効果がある。DNAディスク1の表面とレンズ18との間隔を求める方法としては、非点収差法、フーコー法、ナイフエッジ法、SSD法等を用いれば

よい。

【0075】次に本発明による第3の実施の形態のDNAアレイ製造装置について、図4を参照して説明する。図4は、第3の実施の形態のDNAアレイ製造装置の概略構成図である。第3の実施の形態のDNAアレイ製造装置では、第1の実施の形態のDNAアレイであるDNAディスクを作製する場合を例にしている。以下では、第3の実施の形態のDNAアレイ製造装置をDNAディスク製造装置と呼ぶ。

【0076】位置検出用光源であるトラッキング／アドレス用光源26から出射した光は、コリメータレンズ27、
10 ハーフミラー28を透過し、ハーフミラー29にて反射され、レンズ30によって集光されてDNAディスク1上のアルミ反射面31に照射される。コリメータレンズ27、ハーフミラー29、レンズ30が位置検出用光源から出射される光を基板に照射する照射光学系を構成する。

【0077】アルミ反射面31からの反射光は、レンズ30、ハーフミラー29を通してハーフミラー28によってトラッキング／アドレス検出光学系32に導入される。レンズ30、ハーフミラー29、ハーフミラー28、トラッキング／アドレス検出光学系32が反射光検出光学系を構成する。
20 トラッキング／アドレス検出光学系32は、図3に示したDNAディスク読み取り装置と同様の方法でトラッキングサーボを行い、アドレスマークを読み取り、DNAディスク1上の位置座標を出力する。

【0078】制御装置33は、トラッキング／アドレス検出光学系32からの位置情報に基づき、光反応性保護基除去用光源34のオン／オフを制御ことができる。DNAディスク製造装置の光学系35は、光源、受光素子、光学素子が一体化しており、光学系35は図4中に矢印36で示したDNAディスク1の中心から外周に向かう半径内の任意の位置に移動できる構成になっている。つまり、DNAディスク製造装置はDNAディスク1上に照射される光とDNAディスク1との相対的な位置を変化させる移動装置を有している。
30

【0079】DNAディスク1は、ガラス表面全体にシランカップリング剤を用いてアミノ基が導入されており、更に、従来技術のフォトリソグラフィ技術によるDNAプローブの作製技術で使用されたものと同様の機能を有する光反応性保護基が結合されている。DNAディスク1はスピンドル37に固定され、モーター38で回転させられる。
40

【0080】トラッキング／アドレス検出光学系32を用いて、DNAディスク1上の位置を検出し、ヌクレオチドを結合させたいDNAディスク1上の位置が光スポットの直下に来たときに、光反応性保護基除去用の光源34をオンにする。光源34を出た光は、レンズ39、30を透過し、当該スポットの光反応性保護基を除去する。ここに、結合させたいヌクレオチドの含まれた溶液を導入する。すると光反応性保護基が除去されたスポットにのみ所定のヌクレオチドを結合させることができる。これを所望のヌクレオチド配列が得られるまで繰返すことにより、DNAデ
50

ィスク1にDNAプローブを固定化する。レンズ30、レンズ39が光反応性保護基除去用光源から出射される光を基板に照射する照射光学系を構成する。

【0081】なお、第3の実施の形態においては、光反応を用いてオリゴヌクレオチドをDNAディスク表面に固定化したが、トラッキング用光スポットと既知の位置関係にあるインクジェット装置や、マイクロスポッティングピンを用いてスポットを固定化してもよい。

【0082】また、第3の実施の形態においては、回転に伴いDNAディスク1の表面が変動してもレンズ30とDNAディスク1の表面との間隔を一定に保つフォーカシングサーボ機構を有することが好ましい。これによりDNAディスクの表面が歪んでいて、回転に伴いDNAディスクの表面が変動する場合でも、DNAプローブを固定化することが可能となるという効果がある。DNAディスク1の表面とレンズ30との間隔を求める方法としては、非点収差法、フーコー法、ナイフエッジ法、SSD法等を用いればよい。

【0083】また、第2及び第3の実施の形態において、トラッキングマークの追従及びアドレスマークの読み取りを行わない場合、トラッキング／アドレス光学系は無くてもよい。

【0084】また、第2及び第3の実施の形態において、トラッキングマークの追従及び／またはアドレスマークの読み取りを行わない場合、第1の実施の形態のDNAディスクは、アドレスマーク及び／またはトラッキングマークを有しなくてもよい。さらに、アドレスマーク及びトラッキングマークが無い場合、反射面であるアルミ反射膜は、無くてもよく、基板は表面に透明部材が積層されていないとよく、スポットは基板の表面に形成されていてもよい。

【0085】

【発明の効果】本発明によるDNAアレイ、及びDNAアレイ読み取り装置によれば、コンフォーカル顕微鏡による高いS/N比を維持したまま、高速にDNAアレイを走査することができる。これにより、DNAディスクの読み取り時間を短縮させることができるという効果がある。

【0086】また、個々のDNAプローブが固定化されたスポットを個別にランダムにアドレスすることができるため、積算測定によるノイズの除去を高速に行うことができるという効果がある。

【0087】また、多種類のDNAプローブを有する標準化したDNAアレイを量産し、必要なスポットのみを測定の対象とすることによって、DNAチップを用いた検査のコストを低減させることができるという効果がある。

【図面の簡単な説明】

【図1】第1の実施の形態のDNAアレイを示す概略構成図である。図1(a)は第1の実施の形態のDNAアレイ全体を示す概略構成図であり、図1(b)は図1(a)の四角形4で示された部分を拡大した模式図である。

【図2】トラッキングマーク間の配列の長さ方向の一系列のスポットを模式に示す図である。

【図3】第2の実施の形態のDNAアレイ読み取り装置の概略構成図である。

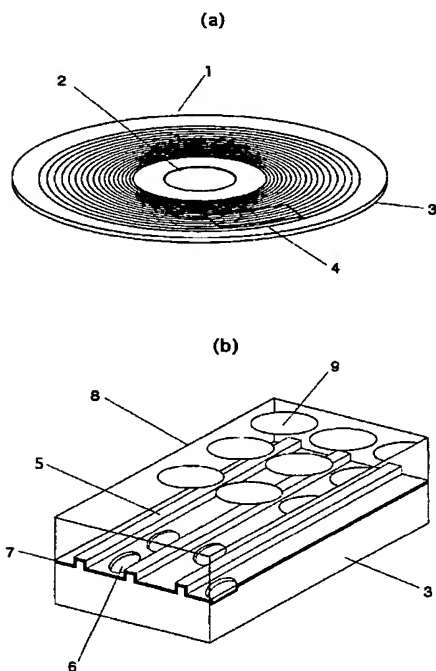
【図4】第3の実施の形態のDNA製造装置の概略構成図である。

【符号の説明】

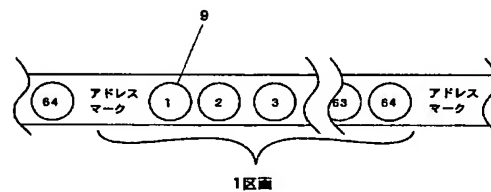
- 1 DNAアレイ (DNAディスク)
- 2 穴
- 3 基板
- 5 トラッキングマーク
- 6 アドレスマーク
- 7、19、31 アルミ反射層
- 8 ホウ珪酸ガラス層
- 9 スポット
- 10、37 スピンドル

- 11 サーボモーター
- 12、35 光学系
- 14 光源
- 15、27 コリメータレンズ
- 16、28、29 ハーフミラー
- 17、21 ミラー
- 18、22、30 レンズ
- 20、32 トラッキング/アドレス検出光学系
- 23 アパチャー
- 10 24 光検出器
- 25 演算装置
- 26 トラッキング/アドレス用光源
- 33 制御装置
- 34 光反応性保護基除去用光源
- 38 モーター

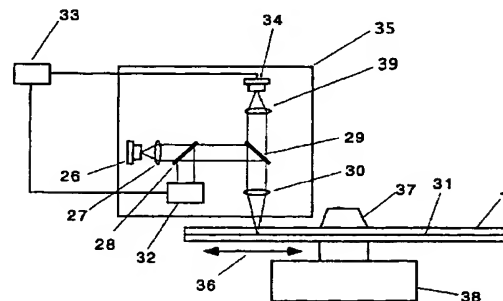
【図1】



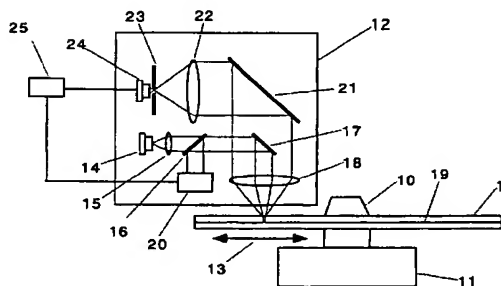
【図2】



【図4】



【図3】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁷

識別記号

G 0 1 N 33/566
35/02

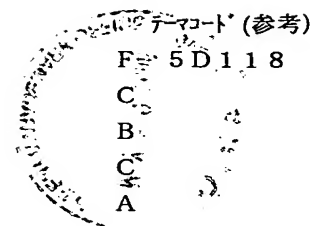
F I

G 0 1 N 35/02

G 1 1 B 7/09

// G 1 1 B 7/09

C 1 2 N 15/00



F ターム(参考) 2G043 AA04 BA16 CA03 DA02 EA01
 FA01 GA07 GB01 GB19 HA01
 HA02 HA09 LA01 NA01 NA06
 2G058 AA09 CC02 CC03 CC09 CD05
 GA02 GC06
 4B024 AA01 AA11 AA20 CA09 HA14
 4B029 AA07 BB20 CC03 FA15
 4B063 QA01 QA08 QA13 QA18 QA19
 QQ42 QQ52 QR32 QR55 QR82
 QS34 QS39 QX02
 5D118 AA06 BA01 BB00 BC04 BC12
 CD03 CD07

BEST AVAILABLE COPY



This Page Blank (uspto)